

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΗΣ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ
ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Θέμα: «Επίδραση οξυτετρακυκλίνης σε έντερο λαβρακίου με τη χρήση
LB θρεπτικού μέσου.»**

Ηλιάδου Μαρία Σουλτάνα

Λαθουράκη Μαρία - Άννα

ΒΟΛΟΣ 2021



Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

- 1) **Κωνσταντίνος Κορμάς**, Καθηγητής, Μικροβιακή Οικολογία Υδάτινου Περιβάλλοντος, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας Και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, ***Επιβλέπων***
- 2) **Ελένη Γκολομάζου**, Επίκουρη Καθηγήτρια, Προστασία – Ευζωία Ιχθύων, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας Και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, ***Μέλος***
- 3) **Μιχαήλ Γεώργιος**, Επίκουρος Καθηγητής, Φαρμακολογία Αγροτικών Ζώων και Ζώων Εργαστηρίου με έμφαση στην Μικροβιακή Αντοχή, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας Και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, ***Μέλος***



Αφιέρωση

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα θέλαμε, μετά από όλη αυτήν την προσπάθεια, να ευχαριστήσουμε τους πιο κοντινούς μας ανθρώπους, την οικογένεια μας, για τη στήριξη και κατανόηση που μας παρείχε κατά την διάρκεια όλης της διπλωματικής μας διατριβής. Ακόμη τους φίλους, συμφοιτητές και συναδέλφους του τμήματος του πανεπιστημίου μας, οι οποίοι ήταν επίσης συνοδοιπόροι και υποστηρικτές της προσπάθειας μας. Η συναισθηματική στήριξη ήταν πολύ σημαντική αλλά το αποτέλεσμα δεν θα είχε φτάσει εις πέρας χωρίς την πρακτική βοήθεια που ήταν πραγματικά αναγκαία.

Δεν θα μπορούσαμε λοιπόν να παραλείψουμε να ευχαριστήσουμε τον υπεύθυνο καθηγητή της διπλωματικής μας, κύριο Κορμά για την ευκαιρία που μας έδωσε να αφομοιώσουμε πως εξελίσσεται μια πειραματική εργασία από την αρχή ως το τέλος, για τις τόσες γνώσεις που μας μεταλαμπάδευσε, αλλά και για την άποψη καθοδήγησή του σε κάθε χρονική φάση της διατριβής μας.

Ακόμη τον ευχαριστούμε, μαζί και με άλλους αρμόδιους καθηγητές για την παραχώρηση των εργαστηρίων τους, διότι χωρίς την προσωπική, ζωντανή και καθημερινή μας ενασχόληση δεν θα είχαμε καταφέρει να γνωρίσουμε την ομορφιά ενός ερευνητικού πειράματος.

Τέλος, θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε η μία την άλλη, για την άποψη συνεννόηση και αλληλοϋποστήριξη που μας διακατείχε, καθώς και για τις ατέλειωτες ώρες έρευνας, διατριβής, ενασχόλησης, και καταγραφής της διπλωματικής που περάσαμε μαζί. Ευχαριστούμε και πάλι πολύ.

Ηλιάδου Μαρία Σουλτάνα

Λαθουράκη Μαρία - Άννα



ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν ο εντοπισμός ανθεκτικότητας ή μη στο αντιβιοτικό οξυτετρακυκλίνη (OTC), ευρέως γνωστό αντιβιοτικό για την χρήση του στις υδατοκαλλιέργειες, σε θεραπευτικό μέσο LB, σε έντερο λαβράκιου. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε πάνω σε λαβράκια (*Dicentrarchus labrax*) από τις μονάδες του Τμήματος Γεωπονίας, Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος. Για τις ανάγκες της διατριβής χρησιμοποιήθηκαν σκεύη και αναλυτές από το εργαστήριο γενετικής του τμήματος, όπου εκεί πραγματοποιήθηκε και η προετοιμασία των δειγμάτων. Στη συνέχεια αξιοποιήθηκαν το φασματοφωτόμετρο και το επωαστήριο του εργαστηρίου της «φυσιολογίας θρέψης». Τα δείγματα αφού ήταν έτοιμα για καλλιέργεια τοποθετήθηκαν στον επωαστήρα. Πραγματοποιούνταν φωτομέτρηση 3 φορές τη μέρα και στη συνέχεια επανατοποθετούνταν στον επωαστήρα μέχρι την επόμενη φωτομέτρηση για την ανάπτυξη μικροοργανισμών. Συνολικά έγιναν 9 φωτομετρήσεις, σε αυστηρό ωράριο κάθε 8 ωρών, συνεπώς η διάρκεια του πειράματος ήταν περίπου 3,5 μέρες. Τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης έδειξαν πως οι μικροοργανισμοί αναπτύχθηκαν τόσο στο θεραπευτικό μέσο LB₀, όπου υπήρχε προσθήκη αντιβιοτικού, όσο και στο LB₁, όπου δεν υπήρχε προσθήκη αντιβιοτικού. Κατά αυτόν τον τρόπο αποδείχθηκε ότι υπάρχει ανθεκτικότητα στην οξυτετρακυκλίνη.

Λέξεις-κλειδιά: Οξυτετρακυκλίνη, αντιβιοτικό, Λαβράκι



ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1 Αντιβιοτικό	1
1.1.1 Σκοπός	1
1.1.2 Ανθεκτικότητα	1
1.1.3 Αντιβιοτικά και Περιβάλλον	2
1.1.4 Ιστορική αναδρομή	2
1.2 Οξυτετρακυκλίνη	2
1.2.1 Ορισμός	2
1.2.2 Χαρακτηριστικά οξυτετρακυκλίνης	3
1.2.3 Χρήση της στις υδατοκαλλιέργειες	3
1.2.4 Ανθεκτικότητα	4
1.3 Λαβράκι	4
1.3.1 Πεπτικό σύστημα	5
1.3.2 Εντερικά μικρόβια	6
1.4 Θρεπτικό υπόστρωμα	6
1.4.1 Θρεπτικό υπόστρωμα LB medium	7
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	7
2.1 Μεθοδολογία του πειράματος	7
2.2 Ανάλυση αποτελεσμάτων	9
2.3 Ρυθμός αύξησης – Τάχος αύξησης	9
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ	10-18



4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	19
-----------------------------	-----------

5. ABSTRACT.....	20
-------------------------	-----------

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	
------------------------	--



1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1) Αντιβιοτικό

Με τον όρο αντιβιοτικό εννοούμε μόρια μικρού μοριακού βάρους τα οποία σε μικρές ποσότητες αναστέλλουν την ανάπτυξη μικροοργανισμών είτε προσωρινή είτε μόνιμη. Είναι φυσικά παράγωγα μικροοργανισμών, παρόλα αυτά στην σύγχρονη εποχή περιλαμβάνονται και τα ημι-συνθετικά και συνθετικά. Έχουν δύο τρόπους δράσης, το ευρύ φάσμα που καλύπτει μια πληθώρα βακτηρίων και το στενό φάσμα που δρα σε όσο το δυνατόν περισσότερο σε συγκεκριμένα βακτήρια.

1.1.1) Σκοπός

Τα αντιβιοτικά χρησιμοποιούνται κυρίως για θεραπευτικούς σκοπούς. Μερικές φορές χρησιμοποιούνται είτε ως προληπτικά μέσα είτε ως μέσα επιτάχυνσης της ανάπτυξης των ιχθύων στην υδατοκαλλιέργεια. Επίσης, υπάρχουν αντιβακτηριδιακά αντιβιοτικά τα οποία είτε καταστρέφουν τα βακτήρια (βακτηριοκτόνα) είτε αποτρέπουν τον πολλαπλασιασμό τους (βακτηριοστατικά). Τα βακτηριοκτόνα είναι ουσίες, οι οποίες σκοτώνουν εκλεκτικά τα βακτήρια, αντίθετα τα βακτηριοστατικά εμποδίζουν την ανάπτυξη των βακτηρίων μέσω της βακτηριακής αλληλεπίδρασης. Τέλος, τα αντιβιοτικά μπορούν να δράσουν και σε άλλες κατηγορίες μικροοργανισμών, όπως μύκητες, παράσιτα, ωστόσο δεν θεωρούνται να είναι αποτελεσματικά στους ιούς (Martins et al., 2014)

1.1.2) Ανθεκτικότητα

Παρόλα αυτά η συχνή και αυξημένη χορήγηση τους στα ψάρια μπορεί να έχει μεγάλο αντίκτυπο στην μικροβιακή κοινότητα του εντέρου των ιχθύων, μειώνοντας την ποικιλομορφία και τον αριθμό βακτηρίων της. Ωστόσο το πλέον πρόβλημα δεν είναι η εμφάνιση ανθεκτικότητας σε βακτήρια αλλά σε ανθεκτικά γονίδια, καθώς και οι επιπτώσεις τους είτε μακροπρόθεσμα είτε βραχυπρόθεσμα. Οι συνθέσεις γαστρεντερικών μικροβίων ποικίλουν ανάλογα με διάφορες παραμέτρους, όπως το είδος ιχθύος, αναπτυξιακό στάδιο, διατροφικές συνήθειες, περιβαλλοντικές συνθήκες καθώς και η έκθεση τους σε χημικά συστατικά, συμπεριλαμβανομένων και των αντιβιοτικών. Η μικροβιακή αντοχή είναι η ικανότητα των μικροοργανισμών να



αντιστέκονται στις αντιμικροβιακές θεραπείες. Στην περίπτωση θεραπειών με αντιβιοτικά, η μικροβιακή αντοχή χαρακτηρίζεται ως αντοχή στα αντιβιοτικά, κάτι το οποίο απασχολεί ιδιαίτερα στη σύγχρονη εποχή.

1.1.3) Αντιβιοτικά και Περιβάλλον

Η πιο διαδεδομένη ύπαρξη πλέον των αντιβιοτικών, όπου δημιουργούν και μια ανθεκτικότητα είναι η είσοδος τους στο περιβάλλον, όπου επιδρά στα βακτήρια που συναντά και είναι δυνατόν να αλλάζει τη βιοκοινότητά τους (Sukul and Spiteller, 2007). Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε στελέχη μικροοργανισμών ιδιαίτερα ανθεκτικών που στην πορεία του χρόνου ενδεχομένως να μην καταπολεμούνται από αντιβιοτικά (BGVV, 1997). Σε συνδυασμό με την υπερβολική χρήση τους επιταχύνθηκε κυρίως η αντοχή στα αντιβιοτικά στο γλυκό νερό, προκαλώντας δυνητικό κίνδυνο για τη δημόσια υγεία σε ολόκληρο τον κόσμο (Walsh and Amyes, 2004).

1.1.4) Ιστορική αναδρομή

Απόπειρες για την χρησιμοποίηση ουσιών που προέρχονται από έναν οργανισμό για αναστολή της αύξησης ή θανάτωση άλλων άρχισαν πριν 2.500 περίπου χρόνια, όταν οι Κινέζοι ανακάλυψαν τις θεραπευτικές ιδιότητες της μουχλιασμένης στάλπης της σόγιας και χρησιμοποίησαν αυτή την ουσία για να θεραπεύσουν δοθιήνες, ψευδάνθρακες και παρόμοιες λοιμώξεις. Πολλοί άλλοι πολιτισμοί, συμπεριλαμβανομένων των Αρχαίων Αιγυπτίων και των Αρχαίων Ελλήνων, χρησιμοποιούσαν ήδη μύκητες και φυτά για να θεραπεύσουν μολύνσεις εξαιτίας της παραγωγής των αντιβιοτικών ουσιών από αυτούς τους οργανισμούς. Εκείνη τη περίοδο όμως οι ενώσεις που αναπτύσσουν κάποια αντιβιοτική δράση ήταν άγνωστες. (Madigan et al. 2014)

1.2) Οξυτετρακυκλίνη

1.2.1) Ορισμός

Η οξυτετρακυκλίνη (OTC) είναι ένα από τα ευρέως γνωστά αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται σε όλους τους κλάδους και αρκετά συχνά εφαρμοζόμενο στον κλάδο της ιχθυολογίας. Θεωρείται η πιο αποτελεσματική και συχνά χρησιμοποιούμενη φαρμακευτική ουσία είτε ως θεραπευτικό μέσο είτε προληπτικά στις



υδατοκαλλιέργειες, κυρίως στους ιχθυογεννητικούς σταθμούς και στις μονάδες πάχυνσης. Ανήκει στην κατηγορία αντιβιοτικών με ευρύ φάσμα δράσης.

1.2.2) Χαρακτηριστικά οξυτετρακυκλίνης

Χαρακτηριστικά της οξυτετρακυκλίνης που την έχουν καταστήσει το πλέον κοινώς χρησιμοποιούμενο αντιβιοτικό στις υδατοκαλλιέργειες είναι τα εξής :

- εμφανίζει αντιμικροβιακή δράση εναντίον πολλών μικροοργανισμών
- δεν παρουσιάζει σημαντική τοξική δράση κατά των ευκαρυωτικών κυττάρων
- είναι φθηνή η παρασκευή της

Είναι μια από τις παλαιότερες τετρακυκλίνες. Ανακαλύφθηκε την δεκαετία του 1940, ύστερα από την απομόνωση του από τον στρεπτομύκητα εδάφους, για αυτό και το όνομα της (Terra = έδαφος). Αποτελείται από 4 δακτυλίους και είναι παράγωγο του ναφθαλενίου, κρυσταλλικές, αμφοτερικές ενώσεις, σχετικά ευδιάλυτες στο νερό. Η οξυτετρακυκλίνη επηρεάζει τα ριβοσώματα (30s) ως προς την αναστολή της πρωτεϊνσύνθεσης. Έχει παρατηρηθεί ότι επηρεάζει κυρίως γονιδιακά, αλλά στις περιπτώσεις το πεπτικού συστήματος μειώνει τις δραστηριότητες καταλάσης του εντέρου. Δρα κατά των βακτηρίων Gram θετικά και αρνητικά, καταστρέφει μόνο τις βλαστικές μορφές του βακτηρίου και όχι τα σπόρια αυτού, χρησιμοποιείται για την θεραπεία βακτηριακών λοιμώξεων που επηρεάζουν το ψάρι (π.χ. δερματίτιδα, υρίνινη). Μερικά από τα βακτηριακά είδη που γίνεται χρήση οξυτετρακυκλίνης είναι τα: *Flexibacter columnaris* (Στηλώδης νόσος), *Flexibacter psychrophila* (Νέκρωση των πτερυγίων και της ουράς), *Yersinia ruckeri* (Ερυθροστοματίτιδα), *Edwardsiella tarda*, *Edwardsiella ictaluri*, *Vibrio spp* (Δονακίωση), *Aeromonas salmonicida* (Δοθιήνωση των σολομοειδών). *Streptococcus spp* κ.ά. Χρησιμοποιείται επίσης και εναντίων ρικετσιακών νοσημάτων, μικροοργανισμοί με πολύ μικρές διαστάσεις.

1.2.3) Χρήση της στις υδατοκαλλιέργειες

Στις υδατοκαλλιέργειες η οξυτετρακυκλίνη χορηγείται με διάφορες τεχνικές:

- Ενσωματωμένη στην τροφή: Συνηθέστερος τρόπος χορήγησης με την ενσωμάτωση τους στην ιχθυοτροφή. Όταν το αντιβιοτικό χορηγείται μέσω της τροφής, χορηγείται σε δόσεις που ποικίλλουν σε mg/kg ψαριού/ ημέρα. Μια



ήπ[συνήθης πρακτική πριν από τη χορήγηση της οξυτετρακυκλίνης, είναι η χορήγηση και άλλων αντιβιοτικών, καθώς και τα ψάρια να παραμένουν σε ασιτία κάποιες μέρες.

- Διαλυμένη στο νερό: Με την χρήση των φαρμακευτικών λουτρών, κυρίως για εξωπαράσιτες ασθένειες που οφείλονται σε ασθένειες και ιώσεις από επιμολύνσεις
- Ενέσιμη μορφή: Χορήγηση μέσω ένεσης, γι αυτό και θεωρείται η πιο αποδοτική μέθοδος για την παραμονή του αντιβιοτικού στον οργανισμό και λιγότερη αποβολή του στο περιβάλλον

1.2.4) Ανθεκτικότητα

Λόγο της μη τοξικότητας της και της συχνής χρήσης της ως θεραπευτικό μέσο (περίπου το 70%) παρατηρείται μια ανθεκτικότητα πλέον τόσο ως προληπτικό όσο και ως θεραπευτικό μέσο. Η έλευση της αντοχής στα αντιβιοτικά σε πολλούς τομείς, συμπεριλαμβανομένης της υδατοκαλλιέργειας, θέτει επίσης σε κίνδυνο την αποτελεσματικότητά τους. Επιπλέον, είναι γνωστό ότι οργανισμοί όπως τα ψάρια, δεν απορροφούν όλη την ΟΤC που καταναλώνεται και περισσότερο από το 90% αυτής της χημικής ουσίας μπορεί να απεκκρίνεται στα κόπρανα και στα ούρα. Παρόλα αυτά η χρονική διάρκεια της ενεργότητας της οξυτετρακυκλίνης στο υδάτινο περιβάλλον ποικίλλει ανάλογα την περιοχή και την εποχή.

1.3) Λαβράκι

Ομοταξία	OSTEICHTHYES
Υφομοταξία	ACTINOPTERIGII
Τάξη	PERCIFORMES
Υπόταξη	PERCOIDEI
Οικογένεια	SERANIDAE
Γένος	DICENTRARCHUS
Είδος	LABRAX



Η εργασία αυτή διεξάχθηκε πάνω στο λαβράκι και συγκεκριμένα σε δείγμα εντέρου του λαβρακίου. Παρακάτω παρατίθενται μερικές γενικές πληροφορίες σχετικά με τον ιχθύ του πειράματός και την ανατομία του εντέρου του.

Το λαβράκι είναι ένας ιχθύς πολύ κοινός στη Μεσόγειο και στις ανατολικές ακτές του Ατλαντικού. Είναι ευρύαλο είδος και ζει σε ποικίλες θερμοκρασίες, γι αυτό και είναι σημαντικής εμπορικής σημασίας. Αποτελείται από επίμηκες σώμα με δύο ραχιαία πτερύγια. Το λαβράκι φέρει κυκλοειδή λέπια και στην πλευρική γραμμή του σώματος του υπάρχουν περίπου 72 λέπια. Το μήκος αυτού του ψαριού είναι συνήθως 45cm, κάποια άτομα όμως φτάνουν και το 1m.

Μπορεί να προσαρμοστεί σε διάφορα επίπεδα αλατότητας, παρόλα αυτά συνηθίζει να προτιμάει τα υφάλμυρα νερά. Παρατηρείται ότι συχνάζει σε παράκτια ύδατα ανεξάρτητα από το βάθος τους. Είναι εξαιρετικά αδηφάγο. Τρέφεται με μικρά ιχθύδια, κεφαλόποδα και καρκινοειδή.

1.3.1) Πεπτικό σύστημα

Ο πεπτικός σωλήνας των ιχθύων παρουσιάζει διαφοροποιήσεις μεταξύ των ειδών, σκοπός των οποίων είναι η βέλτιστη αξιοποίηση των θρεπτικών στοιχείων που εισέρχονται στον οργανισμό (Ray & Ringø 2014). Όσον αφορά το πεπτικό σύστημα του λαβρακίου, είναι το τυπικό των σαρκοφάγων ιχθύων, αποτελείται από το στόμα, τον οισοφάγο, το στομάχο, τον πυλωρό, τα πυλωρικά τυφλά, το έντερο (πρόσθιο και οπίσθιο τμήμα) και την έδρα. Το έντερο των ιχθύων δεν είναι αρκετά εύκολο να διαχωριστεί σε τμήματα. Ακριβώς μετά τον πυλωρό, ο πεπτικός σωλήνας ονομάζεται έντερο, το οποίο διακρίνεται σε πρόσθιο τμήμα, σε οπίσθιο τμήμα εντέρου και έδρα. Τα πυλωρικά τυφλά, που βρίσκονται στο πρόσθιο τμήμα του εντέρου, είναι αποφύσεις του λεπτού εντέρου και η ιστολογική τους δομή διαφέρει από αυτήν του εντέρου που είναι, από μέσα προς τα έξω, βλεννογόνος, υποβλεννογόνιος, μυϊκός και ορογόνος χιτώνας. Το pH του αυλού τους είναι βασικής αντίδρασης. Γενικά, το μέγεθος του εντέρου αυξάνεται όσο αυξάνεται και η ηλικία του ιχθύ, ενώ τα σαρκοφάγα ψάρια έχουν κατά κανόνα πιο μικρό έντερο (σε σχέση με τα φυτοφάγα και τα παμφάγα).

Όσον αφορά την φυσιολογία του εντέρου του λαβρακίου, τα κύτταρα του βλεννογόνου συνθέτουν τα διάφορα πεπτικά ένζυμα και εκκρίνουν υγρά με αντιοξειδωτική δράση.



Υπάρχουν ακόμη προεκβολές του βλεννογόνου χιτώνα, που ονομάζονται εντερικές λάχνες. Είναι απορροφητικά κύτταρα με κυλινδρικό σχήμα, που αυξάνουν την επιφάνεια επαφής του εντερικού χυλού με τα τοιχώματα του εντέρου. Τα ένζυμα του εντέρου περιλαμβάνουν εντερικής προέλευσης πρωτεάσες, καρβοξυδάσες, εστεράσες, παγκρεατικής προέλευσης πρωτεάσες και μικροχλωριδικής προέλευσης αμυλάσες.

1.3.2) Εντερικά μικρόβια

Το λαβράκι μπορεί να εμφανίζει κυρίαρχη συμπεριφορά, οδηγώντας σε διαφορετικούς ατομικούς ρυθμούς ανάπτυξης, οι οποίοι μπορεί να οφείλονται εν μέρει στη μεταβλητότητα των εντερικών μικροβίων, εκτός από γενετικούς παράγοντες. Σε συστήματα ροής νερού, μπορεί να υπάρχει διασταυρούμενη μόλυνση μεταξύ των βακτηριακών κοινοτήτων στο έντερο του ψαριού, στο δέρμα των ψαριών και σε αυτές που προσκολλούνται στο τοίχωμα της δεξαμενής. Τα ενεργά μικροβιότα που σχετίζονται με τον εντερικό βλεννογόνο μπορεί να ποικίλλουν σημαντικά μεταξύ των ατόμων με λαβράκι και μεγάλα δείγματα που συλλέγονται σε αρκετές δεξαμενές θα είναι απαραίτητα για την προσπάθεια κατανόησης των πιθανών ρόλων του μικροβίου του εντέρου. Κάποια βακτήρια που έχουν παρατηρηθεί σε έντερο λαβρακίου είναι τα Πρωτεοβακτήρια, Βακτηριοειδή, Actinobacteria, Firmicutes.

1.4) Θρεπτικό υπόστρωμα

Στα πειράματα όπου πραγματοποιείται μικροβιακή καλλιέργεια απαιτούν υπόστρωμα, το οποίο καλείται θρεπτικό μέσο ή θρεπτικό υλικό. Τα συστατικά που περιέχει, προέρχονται από ενζυμική αποδόμηση άλλων περισσότερο σύνθετων ουσιών ζωικής και φυτικής προέλευσης.

Χρησιμοποιούνται για τους εξής λόγους:

- Για την απομόνωση καθαρών καλλιεργειών.
- Για τη διατήρηση καλλιεργειών που έχουν απομονωθεί σε θρεπτικό υλικό, μέσα σε δοκιμαστικούς σωλήνες κεκλιμένης επιφάνειας ή όχι.
- Για την προώθηση της ανάπτυξης μιας συγκεκριμένης κατηγορίας μικροοργανισμών σε βάρος άλλων.



- Για την ανίχνευση μικροοργανισμών συγκεκριμένης κατηγορίας.

Τέλος, κατηγοριοποιείται σε στερεή ή υγρή μορφή. Στο παρόν πείραμα χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό μέσο υγρής μορφής, το οποίο ήταν το LB medium.

1.4.1) Θρεπτικό υπόστρωμα LB medium

Το LB- medium χρησιμοποιείται ευρέως για την καλλιέργεια βακτηριακών καλλιεργειών, αλλά έχει τις ρίζες του στον τομέα των βακτηριοφαγογενετικών. Χρησιμοποιείται για την ανάπτυξη βακτηρίων κυρίως εντερικών ειδών. Επίσης αποτελεί ένα εύκολο μέσο για να παρασκευαστεί και να παρέχει μια ευρεία βάση θρεπτικών ουσιών.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1) Μεθοδολογία του πειράματος

Το πείραμα που πραγματοποιήθηκε αφορούσε την αντίδραση των αντιβιοτικών σε έντερα των λαβρακίων (*Dicentrarchus l.*). Το αντιβιοτικό που χρησιμοποιήθηκε ήταν η οξυτετρακυκλίνη με θρεπτικό μέσο το LB medium.

Το LB παρασκευαστικά με τα εξής υλικά :

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ	ΠΟΣΟ ΠΟΥ ΠΡΕΠΕΙ ΝΑ ΠΡΟΣΤΕΘΕΙ
H ₂ O	950 mL
Τρυπτόνη	10 g
NaCl	10 g
Εκχύλισμα ζύμης	5 g

Γίνεται συνδυασμός των αντιδραστηρίων και έπειτα ανακίνηση μέχρι να διαλυθούν οι διαλυμένες ουσίες. Το pH ρυθμίζεται σε 7,0 με 5N NaOH (0,2mL). Ο τελικός όγκος του διαλύματος μαζί με νερό ρυθμίζεται σε 1 λίτρο. Γίνεται αποστείρωση στο αυτόκαυστο για 20 λεπτά στους 15 psi (1,05 kg / cm²)

Το πείραμα ξεκίνησε με έντερο από *Dicentrarchus labrax* το οποίο εισάγεται σε LB medium, στη συνέχεια ακολούθησε η φυγοκέντρωση στα 1500 g για 2' και στο τέλος



η απομόνωση του εμβολίου. Η καλλιέργεια είναι έτοιμη, ενώ έχει πραγματοποιηθεί τρεις φορές η παραπάνω διαδικασία, και ακολουθείται η καλλιέργεια στους 20° C. Συνολικά υπήρχαν 6 δείγματα, 3 μάρτυρες και 3 δείγματα με προσθήκη αντιβιοτικού. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε φωτομέτρηση κάθε 8 ώρες με OD₅₄₀ με διάρκεια 4 ημερών.

Για την έναρξη του πειράματος έγινε τοποθέτηση 20 gr LB medium σε 1L uH₂O. Ζυγίστηκαν 2 gr LB για τα 6 δείγματα. Εν συνεχεία μετρήθηκαν 100 ml νερού για κάθε δείγμα. Έγινε ελαφρώς ανάδευση με το χέρι μέχρι να ομογενοποιηθεί πλήρως. Τέλος, τοποθετήθηκαν τα δείγματα στο αυτόκαυστο, τα οποία ήταν ελαφρώς κλειστά, ώστε να διεισδύσει ο υδρατμός μέσα (121° C για 15 min).

Μετά την αποστείρωση τοποθετήθηκαν τα δείγματα στο ψυγείο.

Καθώς είναι απαραίτητοι όλοι ο μικροοργανισμοί που υπάρχουν μέσα στο έντερο (στις εντερικές λάχνες και στα κόπρανα), προστέθηκαν 500 μL νερού σε 2 gr ιστού εντέρου ώστε να πραγματοποιηθεί η πολτοποιήση με την γυάλινη ράβδο. Έπειτα έγινε φυγοκέντριση για να διαχωριστούν οι ιστοί. Τέλος, κρατήθηκε το υπερκείμενο και ξανά πραγματοποιήθηκε η φυγοκέντριση σε αυτό (μόνο του).

Κάθε ένα από τα 6 θρεπτικά μέσα εμβολιάζεται με 90μL, ώρα 9:25 π.μ. Ο εμβολιασμός πραγματοποιείται με πιπέτα κοντά στη λύχνο του Bunsen για τοπική αποστείρωση, για την αποφυγή τυχόν μολύνσεων.

Χρησιμοποιήθηκαν μάρτυρες χωρίς εμβολιασμό, ώστε να αναμένεται μηδενική ανάπτυξη. Με βάση τους μάρτυρες μηδενίζεται και το φωτόμετρο.

Για τη διαδικασία της φωτομέτρησης τοποθετείται σε μια κυψελίδα υπερκάθαρο νερό και σε μια άλλη το δείγμα κι έπειτα τοποθετούνται στο φασματοφωτόμετρο.

Μετά τη φωτομέτρηση τοποθετήθηκαν τα δείγματα στον επωαστήρα μέχρι την επόμενη μέτρηση με στόχο την ανάπτυξη μικροοργανισμών. Η συγκέντρωση της οξυτετρακυκλίνης ήταν 100 μgr/ 1 ml . Ωστόσο η τελική συγκέντρωση θα είναι 10 μgr/ 1 ml. Η διαδικασία του πειράματος πραγματοποιήθηκε σε εργαστηριακό χώρο όπου τα δείγματα ήταν τοποθετημένα στον επωαστήρα και δεν υπήρχε ανθρώπινη



παρέμβαση κατά τη διάρκεια ανάπτυξης των μικροοργανισμών, παρά μόνο από τα μέλη της διατριβής κατά τις χρονικές στιγμές που γινόταν η καταμέτρηση (κάθε 8 ώρες).

2.2) Ανάλυση αποτελεσμάτων

Οι μετρήσεις των δειγμάτων καταγραφτήκαν και αναλυθήκαν μέσω στατιστικών προγραμμάτων. Όστε να αποδειχθεί εάν οι τιμές των μετρήσεων του LB₀ και του LB- ήταν στατιστικά σημαντικές. Για αυτό το σκοπό χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πρόγραμμα ANOVA μέσω του πακέτου λογισμικού SPSS.

Η Ανάλυση Διασποράς (ANOVA) καλείται ως η στατιστική μέθοδος πειραματικού σχεδιασμού, κατά την οποία, πραγματοποιείται έλεγχος υποθέσεων με στόχο να ανιχνευθούν εάν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στις μέσες τιμές περισσότερων από δύο πληθυσμούς. Κατασκευάστηκε ένας έλεγχος υποθέσεων με μηδενική υπόθεση (H_0) πως όλα τα δείγματα προήλθαν από πληθυσμούς με την ίδια μέση τιμή έναντι μιας εναλλακτικής υπόθεσης ότι τουλάχιστον οι δύο μέσες τιμές ήταν διαφορετικές. Θεωρητικά, θα μπορούσαν να εφαρμοστούν πολλαπλοί ανεξάρτητοι έλεγχοι, αλλά η συγκεκριμένη μεθοδολογία δεν ενδείκνυται καθότι με αυτό τον τρόπο αυξάνεται η πιθανότητα να οδηγηθούμε σε σφάλμα τύπου I. Συνεπώς, η ANOVA είναι η κατάλληλη μεθοδολογία διότι, πρόκειται για συντομότερη διαδικασία ανάλυσης ενώ έχει και ακρίβεια διάγνωσης.

2.3) Ρυθμός αύξησης – Τάχος αύξησης

Ως τάχος αύξησης ή ρυθμός αύξησης καλείται η αύξηση των μικροοργανισμών ανά μονάδα χρόνου. Συνεπώς παρατηρείται κλίση της καμπύλης σε κάθε χρονική στιγμή t και αντιπροσωπεύει στον αυξητικό ρυθμό της αποικίας. Ο τύπος που τον περιγράφει αναφέρεται ως $\mu = \ln d\mu / dt$.

Σε περίπτωση που όλα τα άτομα διαιρούνται με τον ίδιο ρυθμό τότε σε κάθε χρονική στιγμή ο αυξητικός ρυθμός της αποικίας ($d\mu/dt$) θα είναι ανάλογος με τον αριθμό των μικροοργανισμών (μ).



Στο παρόν πείραμα ο αρχικός αριθμός των μικροοργανισμών είναι 0 και ο τελικός 2,9. Ο χρόνος ξεκίνησε από τις 0 μηδέν μέχρι 80 ώρες.

3) ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

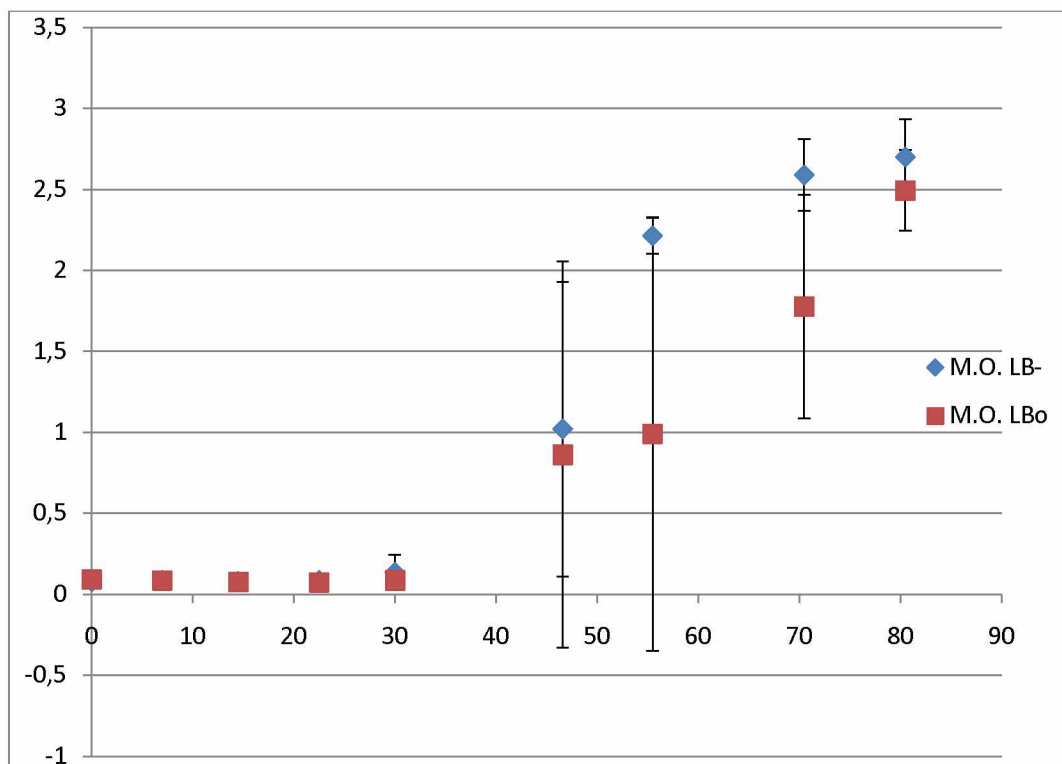
Για την κατανόηση στην ύπαρξη της ανθεκτικότητας ή όχι πραγματοποιήθηκε η καμπύλη αύξησης βακτηρίων (Διάγραμμα 1). Στον y άξονα βρίσκονται βακτήρια ενώ στον x άξονα είναι οι ώρες αύξησης. Με το κόκκινο χρώμα αντιστοιχούν οι μικροοργανισμοί που έχουν στην καλλιέργεια του οξυτετρακυκλίνη ενώ στο μπλε οι μικροοργανισμοί χωρίς οξυτετρακυκλίνη.

Τις πρώτες ώρες και συγκεκριμένα στην φάση προσαρμογής, δεν παρατηρήθηκε σε καμία από τις δύο καλλιέργειες κάποια ιδιαίτερη αύξηση. Αυτό ίσως οφειλόταν στην αρχική κατάσταση των κυττάρων, την θερμοκρασία, την φύση καθώς και την διαδικασία του εμβολιασμού.

Στη συνέχεια κατά την εκθετική φάση άρχισαν να παρατηρούνται διαφορές μεταξύ των δύο καλλιεργειών. Συγκεκριμένα σε αυτή τη φάση ο αριθμός των κυττάρων διπλασιάζεται ανά συγκεκριμένο χρόνο. Στην συγκεκριμένη φάση παρατηρείται και το τάχος αύξησης των μικροοργανισμών, όπου επηρεάζεται από το είδος τους και τις περιβαλλοντικές συνθήκες. Συνεπώς, αναμένεται διαφορετική αύξηση μεταξύ των δυο καλλιεργειών, αφού η μια περιέχει OTC.

Ύστερα κατά την στάσιμη φάση υπάρχει η εξάντληση των ουσιών των θρεπτικών συστατικών και μετέπειτα ακολουθεί η φάση θανάτου.





(Διάγραμμα 1) Διάγραμμα ανάπτυξης μικροοργανισμών με ή χωρίς οξυτετρακυκλίνη.

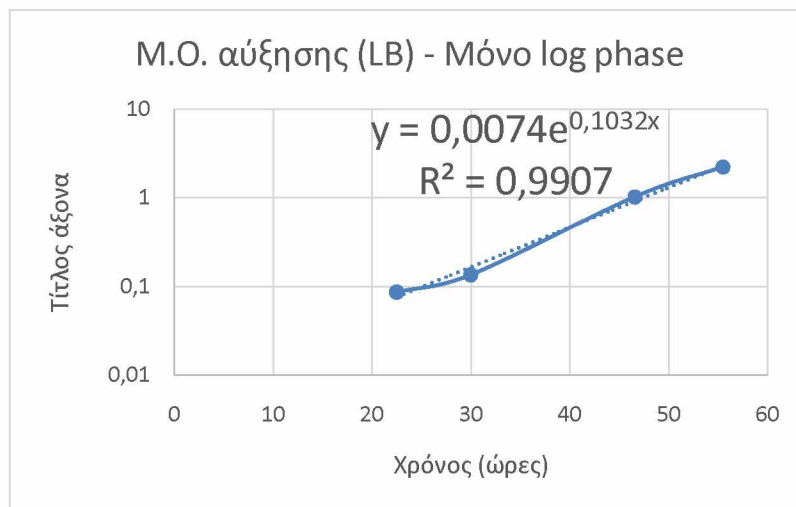
Ωστόσο, στις καλλιέργειες με το LB-, χρειάστηκαν 30 ώρες για την έναρξη ανάπτυξης των μικροβίων, ωστόσο η εκθετική τους φάση ξεκίνησε από τις 50 ώρες και έπειτα, ενώ στις 70 ώρες σταμάτησε η εκθετική τους φάση.

Όσον αφορά το LB₀, χρειάστηκαν εξίσου 30 ώρες για την ανάπτυξη των μικροβίων. Παρατηρήθηκε συντηρητική αύξηση της εκθετικής φάσης μεταξύ 30 και 60 ωρών, ενώ από τις 70 ώρες και μετά ήταν πιο έντονη η εκθετική φάση. Στο LB με οξυτετρακυκλίνη η εκθετική φάση συνεχίστηκε και μετά τις 80,5 ώρες, όπου έλαβε τέλος το πείραμά.

Συνεπώς, παρατηρείται ότι δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές με τη χρήση και μη της οξυτετρακυκλίνης. Εμφανίζεται μία μερική ανθεκτικότητα των μικροβίων στην οξυτετρακυκλίνη, αφού αναπτύχθηκαν μετά τις 30 ώρες και εμφάνισαν σταδιακή εκθετική φάση.

Ως προς τον ρυθμό αύξησης των μικροοργανισμών βρέθηκαν τα εξής αποτελέσματα:





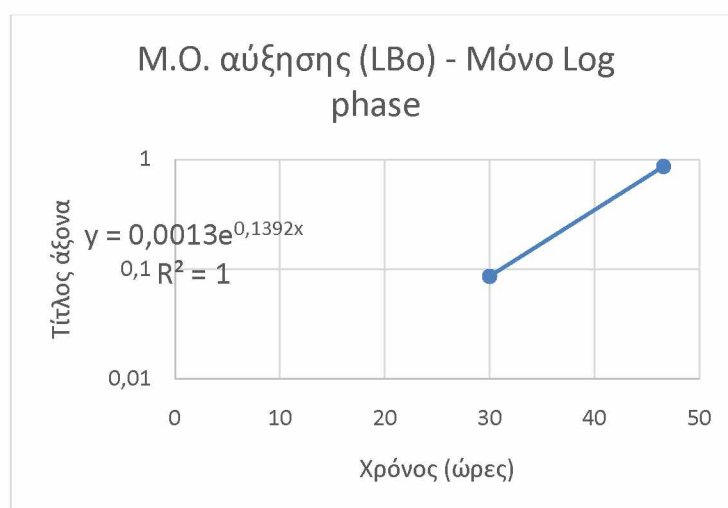
Διάγραμμα 2. Απεικόνιση του χρόνου διπλασιασμού για το LB –

Με βάση το παραπάνω διάγραμμα (2) έχει η χρήση της εξίσωσης $Y=Ae^{Bx}$

όπου ο χρόνος διπλασιασμού ήταν $(Tb) = \ln(2)/B$

Άρα **B= 0,1032**

Tb = 6,71654 ώρες



Διάγραμμα 3. Απεικόνιση για το χρόνο διπλασιασμού του LBo

Ως προς το χρόνο διπλασιασμού του LBo στο διάγραμμα 3 παρατηρείται ότι :



$$B = 0,1392$$

$$Tb = 4,97951 \text{ ώρες}$$

4) ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα παρατηρήθηκε πως υπάρχουν μικροοργανισμοί ανθεκτικοί στην οξυτετρακυκλίνη, που βρίσκονται στην μικροχλωρίδα του εντέρου του λαβρακίου, καθώς παρατηρήθηκε και μια αύξηση του πληθυσμού τους στο φασματοφωτόμετρο και άνοδος της καμπύλης LB_o. Ωστόσο τίθεται το ερώτημα, για ποιο λόγο συμβαίνει αυτή η αντίδραση, πως επηρεάζει η ανθεκτικότητα στο έντερο καθώς και αν προκαλεί κάποιου είδους στρες. Οι λόγοι που κάποια βακτήρια αποκτούν ανθεκτικότητα σε συγκεκριμένα αντιβιοτικά είναι ακόμη υπό έρευνα. Παρόλα αυτά υπάρχουν έρευνες σύμφωνα με τις οποίες αποδείχθηκε πως η εγγενής αντίσταση είναι ένα εγγενές φυσιολογικό, βιοχημικό ή μορφολογικό χαρακτηριστικό του κυττάρου του οργανισμού να αποφεύγει τη δράση του αντιβιοτικού.

Πιθανολογείται να οφείλεται σε τρεις κύριους λόγους :

1. Απουσία της θέσης δράσης (στόχος) στο κύτταρο
2. Ανυπαρξία συγγένειας μεταξύ του αντιβιοτικού και του στόχου του, συνεπώς χρήση ευρέως φάσματος αντιβιοτικού
3. Λόγω της ανικανότητας του αντιβιοτικού να εισέλθει στο κύτταρο βακτηρίων ώστε να επιτύχει τον στόχο του.

Σύμφωνα με σχετικό άρθρο του 2019, αναφέρεται πως σε αντίστοιχο πείραμα σε λαβράκια και τσιπούρες παρατηρήθηκε, πως ανιχνεύθηκαν κατάλοιπα αντιβιοτικών σε κάποια από τα δείγματα που αναλύθηκαν στα αντιβιοτικά ενροφλοξασίνη και οξυτετρακυκλίνη. Η μέθοδος αυτού του πειράματος στόχευε στην ταυτόχρονη ανίχνευση 41 αντιβακτηριδιακών από επτά διαφορετικές κατηγορίες (σουλφοναμίδες, τριμεθοπρίμη, τετρακυκλίνες, μακρολίδες, κινολόνες, πενικιλίνες και χλωραμφενικόλη). Αντίστοιχα πειράματα παράθεσαν αποτελέσματα, στα οποία βρέθηκαν υψηλά ποσά μικροοργανισμών, ανθεκτικών στα αντιβιοτικά, σε λαβράκια και κυρίως σε περιοχές όπως το δέρμα, τα βράγχια και το έντερο. Αυτό συμβαίνει διότι σε



αυτά τα σημεία των ιχθύων διοχετεύονται οι περισσότερες ουσίες που λαμβάνουν κατά τη διάρκεια της ζωής τους. Στο έντερο δεν είναι τόσο μεγάλες οι συγκεντρώσεις των ανθεκτικών μικροοργανισμών αναλογικά με τα άλλα δύο όργανα, ωστόσο κι εκεί ο αριθμός είναι σημαντικός.

Στο αντιβιοτικό οξυτετρακυκλίνη παρατηρείται η μεγαλύτερη ανθεκτικότητα σε σχέση με τα υπόλοιπα αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται σε ιχθυοκαλλιέργειες λαβρακίων. Αυτό οφείλεται στο γεγονός πως είναι ένα από τα πιο σύνηθες αντιβιοτικά που χρησιμοποιείται εδώ και πάρα πολλά χρόνια, σχεδόν από τότε που ξεκίνησε η τεχνική των υδατοκαλλιεργειών. Οι ιχθύες έχουν λάβει υψηλές ποσότητες OTC, ώστε έχουν αναπτύξει μεγάλη ανθεκτικότητα στο συγκεκριμένο αντιβιοτικό. Το γεγονός αυτό, δεν οφείλεται μόνο στην ανθρώπινη παρέμβαση στις ιχθυοκαλλιέργειες, κατά την οποία χρησιμοποιείται οξυτετρακυκλίνη. Πολύ σημαντική συνεισφορά έχει και η ύπαρξη λυμάτων που καταλήγουν στο θαλάσσιο περιβάλλον μέσω των αποχετεύσεων, βιομηχανιών και των συστημάτων ύδρευσης και άρδευσης. Θεωρείται πως η ποσότητα των αντιβιοτικών που φτάνουν στην ανοιχτή θάλασσα σε καθημερινή βάση είναι αρκετά υψηλή, κυρίως από τα νοσοκομεία, ιατρεία και εργαστήρια. Ουσιαστικά το θαλάσσιο περιβάλλον εμποτίζεται με όλα αυτά τα φάρμακα που αποβάλλονται καθημερινά, δημιουργώντας επιπτώσεις στην ισορροπία του οικοσυστήματος.

Ένας άλλος λόγος της άφθονης ύπαρξης οξυτετρακυκλίνης στα θαλάσσια και λιμναία νερά είναι οι απεκκρίσεις των ίδιων των ψαριών. Σύμφωνα με έρευνες στο 90% των τροφών και των φαρμάκων που λαμβάνουν οι ιχθύες σε μία ιχθυοκαλλιέργεια ανοιχτού τύπου, δεν απορροφούνται ή δεν καταναλώνονται με αποτέλεσμα να καταλήγουν στον πυθμένα του υδάτινου περιβάλλοντος.

Η εισαγωγή OTC στο περιβάλλον μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω τεσσάρων κύριων άμεσων οδών:

- (i) ελεύθερα διαλυμένων ιοντικών OTC σε νερό (χηλικά ή / και μη χηλικά) ή από ούρα ψαριού
- (ii) που σχετίζονται με διαλυμένα οργανικά ύλη (DOM)
- (iii) απορροφάται σε οργανικά και ανόργανα στερεά (π.χ. εκρόφηση από ιχθυοτροφές και κόπρανα)



(iv) OTC - φαρμακευτική τροφή που εκπλένεται από μη τροφές

Ακόμη και όταν προστίθεται οξυτετρακυκλίνη στο νερό με τη μορφή σβόλων, τα θραύσματα ενδέχεται να πέσουν και οι ποσότητες της OTC να απελευθερωθούν στο νερό. Στη συνέχεια, ως αποτέλεσμα της υψηλής διαλυτότητάς του στο νερό, είναι προβλέψιμο ότι μπορεί να εκπλυθεί στα υπόγεια ύδατα ή να περάσει στο έδαφος. Κατά αυτόν τον τρόπο το αντιβιοτικό καταλήγει στην θάλασσα, όπου συνεπάγεται η αφθονία του στο υδάτινο περιβάλλον.

Παρόλα αυτά, αυτή η συνεχής έκθεση σε αντιβιοτικά, φαρμακευτικές ουσίες ή περιβαλλοντικές χημικές ουσίες δημιουργούν ένα τυπικό εξωτερικό στρες για τους ιθαγενείς μικροοργανισμούς του εντέρου τόσο στον άνθρωπο όσο και στα ζώα, έχοντας ως αποτέλεσμα να μεταβάλλουν άμεσα τη σύνθεση και τη λειτουργικότητά του. Προκαλούν είτε γονίδια υπεύθυνα για το μεταβολισμό των αντιβιοτικών, φαρμάκων, είτε κάποιου είδους αντοχή στα φάρμακα είτε απόκριση στρες. Η τετρακυκλίνη (TET), η οικογένεια όπου βρίσκεται η οξυτετρακυκλίνη, όπως έχει αναφερθεί είναι ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο αντιβιοτικό για τους θεραπευτικούς σκοπούς στον άνθρωπο και στην κτηνιατρική αντιπροσωπεύοντας το 70% όλων των αντιβιοτικών. Έχουν παρατηρηθεί ποσότητες της έως και 158 $\mu\text{g} / \text{L}$ σε υδρόβια περιβάλλοντα όπως ποτάμια και λύματα. Ως επακόλουθο, η μεγάλη ανθεκτικότητα γονιδίων στο συγκεκριμένο αντιβιοτικό. Το έντερο των ιχθύων και γενικότερα των υδρόβιων οργανισμών θεωρείται ένας σημαντικός χώρος για τη διάδοση γονιδίων αντοχής στα αντιβιοτικά (ARGs) και την άμεση απόκριση των συνθηκών διαβίωσης. Σε παρόμοια πειράματα παρατηρήθηκε πως η αφθονία των περισσότερων γονιδίων αυξάνεται στα βακτήρια που είναι υπεύθυνα για στις ομάδες θεραπείας, καθώς και τα γονίδια εκροής που ανταποκρίθηκαν κυρίως στο στρες της τετρακυκλίνης. Η μόλυνση κυρίως των υδάτων παρουσιάζει σοβαρό στρες σε μικρόβια όπως τα παθογόνα, το οποίο προκαλεί την αύξηση αντοχής στα βακτηρίδια οδηγώντας στην εξάπλωση των γονιδίων αντοχής στα αντιβιοτικά. Στα ζώα τα έντερα τους θεωρούνται ως οικότοπος ποικιλίας βακτηρίων, τα οποία θα μπορούσαν εύκολα να δεχτούν ARG μέσω της οριζόντιας μεταφοράς γονιδίων, ώστε να έχουν μια κατάλληλη τοποθεσία για βακτηριακή διάδοση. Καθώς τα υδρόβια ζώα είναι ευάλωτα σε εξωτερικές επιρροές λόγω του μοναδικού περιβάλλοντος



διαβίωσης, τα έντερα των υδρόβιων ζώων θεωρούνται συνήθως ως μια σημαντική θέση για τη διάδοση των ARGs.

Επιπλέον υπάρχει και η γονιδιωματική ανθεκτικότητα στην οξυτετρακυκλίνη. Μέχρι σήμερα έχουν βρεθεί περίπου 40 διαφορετικά γονίδια που προσδίδουν την ανθεκτικότητα στις τετρακυκλίνες. Παρόλα αυτά δεν υπάρχει διαφορά ανάμεσα στα γονίδια ανθεκτικότητας στην τετρακυκλίνη (tet) και σε αυτά της οξυτετρακυκλίνης. Συνεπώς παρατηρείται η ίδια ανθεκτικότητα. Η γονιδιωματική ανθεκτικότητα που παρατηρείται από τους εξής μηχανισμούς:

- Μεμβρανικές πρωτεΐνες που αποβάλλουν την OTC από το κύτταρο
- Πρωτεΐνες που αποδεσμεύουν το αντιβιοτικό από το ριβόσωμα
- Ενζυμα αποικοδόμησης του αντιβιοτικού

Τα αντιβιοτικά ταξινομούνται με βάση το αντιμικροβιακό φάσμα τους, τις φυσικοχημικές ιδιότητές τους και το μηχανισμό δράσης τους (Μπατζίας, 2003). Ως προς το φάσμα τους ελέγχεται αν προκαλούν κάποιο είδους στρες ως προς την μικροχλωρίδα του εντέρου, καθώς και αν το προκαλούν βραχυπρόθεσμα ή μακροπρόθεσμα. Κυρίως ύστερα από μακροπρόθεσμη έκθεση σε οξυτετρακυκλίνη, όπου παρατηρείτε αλλαγή στους μικροοργανισμούς του εντέρου ως προς το επίπεδο τάξης. Ως προς το κομμάτι του εντέρου επηρεάζει το μεσαίο του μέρος χωρίς όμως κάποια μείωση των ήδη υπαρχόντων βακτηρίων του.

Σε έρευνες που έχουν γίνει παρατηρήθηκε πως υπάρχει κάποια μακροπρόθεσμη ανθεκτικότητα και στο έντερο των ιχθύων, όπου στην πορεία προέκυπταν και προβλήματα υγείας αλλά και ως προς το νερό στο οποίο διαβιώνουν.

Συνεπώς, η πλέον υπέρχρηση της οξυτετρακυκλίνης και γενικότερα των αντιβιοτικών, μπορεί να διευκολύνει τον πολλαπλασιασμό των ευκαρυωτικών βακτηρίων εξαλείφοντας τους ανταγωνιστικούς μικροοργανισμούς. Έτσι σύμφωνα και με το FAO (Διεθνής Οργανισμός Τροφίμων και Γεωργίας) αποτρέπεται η χρήση αντιβιοτικών στις υδατοκαλλιέργειες είτε για προληπτικούς λόγους είτε για την επιτάχυνση της αύξησης των εκτρεφόμενων ειδών.



Όσον αφορά την Ελλάδα δεν υπάρχουν επίσημα στοιχεία για την ποσότητα των αντιβιοτικών που χρησιμοποιούνται στις υδατοκαλλιέργειες. Τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα είναι η οξυτετρακυκλίνη, φλορφενικόλη και φλουμίνη. Ωστόσο σε ένα πείραμα των Rigos et.al (2004) υπολογίστηκε πως ετησίως στην Ελλάδα καταλήγουν στο περιβάλλον ποσότητα αντιβιοτικών (οξυτετρακυκλίνη- οξολινικό οξύ) από την εκτροφή τσιπούρας (*Sparus aurata*)- μυτάκι (*Puntazzo puntazzo*) πάνω από 1900 kg. Συνοπτικά για την παραπάνω εκτίμηση οι ερευνητές έλαβαν υπόψη τους, τη μέση χορηγούμενη δόση των αντιβιοτικών, τη μέση απορρόφηση του αντιβιοτικού από τον οργανισμό του ψαριού, τη μέση συχνότητα χρησιμοποίησής τους για την καταπολέμηση ασθενειών και την ετήσια παραγόμενη ποσότητα τσιπούρα-μυτάκι στην Ελλάδα. Σε αντίστοιχο άλλο πείραμα για την εξέταση ανθεκτικότητας στις ελληνικά ύδατα βρέθηκε πως από τις ιχθυοκαλλιέργειες μόνο το 7% των εκμεταλλεύσεων έχει υπολείμματα αντιβιοτικών με τα επίπεδα συγκέντρωσης να είναι χαμηλά. Παρ' αυτά ο τρόπος με τον οποίο κινούνται και παραμένουν οι ποσότητες της OTC στα ύδατα είναι ταχύς διασκορπισμός από τα ιζήματα από τα παράκτια ρεύματα. (Rigos et al., 2004). Στη συνέχεια απομακρύνονται σταδιακά μέσω των ρευμάτων στις απομακρυσμένες περιοχές (Zou et al., 2011).

Σε άλλες περιοχές εκτός Μεσογείου έχουν βρεθεί συγκεντρώσεις OTC, 287ng / L στον ποταμό Dou στην Κίνα (Zou et al., 2011), 19,2ng / L στον ποταμό Po στην Ιταλία (Calamari et al., 2003) και 340ng / L στο Επιφανειακά ύδατα ΗΠΑ (Kolpin et al., 2002). Σε συστήματα υδατοκαλλιεργειών στη Βραζιλία και την Κίνα οι αντίστοιχες τιμές 7993 και 15163ng / L OTC (Chen et al., 2015; Monteiro et al., 2016).

Έχει αρχίσει να παρατηρείται και μια εν μέρει τοξικότητα των αντιβιοτικών και συγκεκριμένα των τετρακυκλινών λόγω της υπέρχρησής τους και της δυσκολίας αποικοδόμησής τους. Ίσως και εκεί να οφείλεται το γεγονός της ύπαρξης στρες στους ιχθύες εκτός από ανθεκτικότητα. Τα τελευταία χρόνια έχουν γίνει προσπάθειες για διαφορετικές μεθόδους αποικοδόμησης όπως η προσρόφηση, η διήθηση, η ανταλλαγή ιόντων, η βιοαποικοδόμηση και οι προηγμένες διαδικασίες οξείδωσης (AOP) για την απολύμανση διαφόρων τύπων αντιβιοτικών, όχι μόνο για τη μείωση της τοξικότητάς τους, αλλά και για την ενίσχυση της βιοαποικοδομησιμότητας. Καθώς αυτές οι ενώσεις παραμένουν βιοδραστικές στο περιβάλλον, οι οργανισμοί που δεν στοχεύουν ενδέχεται



να εκτεθούν αναπόφευκτα. Στη συνέχεια, μπορούν να αναμένονται επιδράσεις στους ίδιους τους οργανισμούς και στις σχετικές και τις γύρω βακτηριακές κοινότητές τους.

Παρόλα αυτά η παραδοσιακή μέθοδος καλλιέργειας βακτηρίων σε θρεπτικά μέσα με χωρίς προσθήκη αντιβιοτικού έχει εκ φύσης σημαντικά μειονεκτήματα, όπως δυνατότητα καλλιέργειας ενός μικρού ποσοστού μικροοργανισμών. Επίσης επιλογή του εκάστοτε θρεπτικού μέσου καθώς και των συνθηκών επώασης παίζουν καθοριστικό ρόλο (Herwig et.al 1997). Για την καλλιέργεια σε τρυβλία, ανθεκτικών βακτηρίων βασικό ρόλο παίζει το θρεπτικό υπόστρωμα καθώς σύστασή του θα καθορίσει τα είδη βακτηρίων που θα αναπτυχθούν, κάνοντας με αυτό τον τρόπο αδύνατη τη σύγκριση εργασιών που έχουν χρησιμοποιήσει διαφορετικά θρεπτικά μέσα.. Ειδικότερα η χρήση οποιουδήποτε θρεπτικού μέσου θα επιτρέψει την ανάπτυξη ενός μικρού υποπληθυσμού της ολικής μικροβιακής χλωρίδας, επιπλέον η χρήση διαφορετικών θρεπτικών μθα οδηγήσει στην καλλιέργεια βακτηρίων διαφορετικού τύπου και θα επηρεάσει τη συχνότητα εμφάνισης ανθεκτικών βακτηρίων. Συγκεκριμένα οι Pursell et al (1996) συγκρίνοντας τα θρεπτικά μέσα TSCA (Tryptone Soya Citrate Agar) και Marine Agar για δείγματα από ιζήματα που πάρθηκαν κάτω από ιχθυοκλωβούς με ίδιες συγκεντρώσεις οξυτετρακυκλίνης (25 pg/ml) και επώαση στις ίδιες συνθήκες διαπίστωσαν αρκετά υψηλότερα ποσοστά ανθεκτικών βακτηρίων στο δεύτερο θρεπτικό μέσο. Το παραπάνω πάντως δεν αποκλείει την περίπτωση ότι για δείγματα διαφορετικής περιοχής να παρατηρηθεί το αντίθετο φαινόμενο.



4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Συμπερασματικά, στην εργασία αυτή παρατηρείται λοιπόν πως πλέον έχει αρχίσει να υπάρχει μια ανθεκτικότητα ως προς το αντιβιοτικό οξυτετρακυκλίνη. Το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται σε διάφορους παράγοντες με τον πιο πιθανό η ευρεία και χρόνια χρήση του. Ωστόσο υπάρχουν πιθανότητες δράσης του στους ιχθύες μέσω των υδάτων, είτε ιδίως από μολυσμένα ύδατα, εκεί δρα συνήθως σε σημεία όπως δέρμα, βράγχια, είτε από τις φυσικοχημικές ιδιότητες του νερού, που εμφανίζουν μια μεταβλητότητα ανάλογα την εποχή. Επίσης έχουν παρατηρηθεί ποσότητες οξυτετρακυκλίνης σε ύδατα από τα απόβλητα που προκύπτουν στην θάλασσα ύστερα από ανθρώπινες δραστηριότητες· είτε μέσω των φυκιών που αποτελούν τροφή κυρίως σε φυτοφάγους ιχθύες, στην συγκεκριμένη περίπτωση όπου γίνεται ένας φαύλος κύκλος, διότι η οξυτετρακυκλίνη βρίσκεται στις ρίζες των φυκιών, τα οποία καταναλώνονται από τους ιχθύες, αυτοί με την σειρά τους καταναλώνονται από τον άνθρωπο και καταλήγουν πάλι στη θάλασσα μέσω των αποβλήτων.



TITLE: Oxytertracycline resistance in the gut microbiota of sea bass

ABSTRACT

The aim of the present study was to determine whether or not exists resistance to the antibiotic oxytetracycline (OTC), a wide-known antibiotic using in aquaculture, in LB medium, in intestine of *Dicentrarchus labrax*. The experiment was performed on *Dicentrarchus labrax* from the units of the Department of Agriculture, Ichthyology and Aquatic Environment. For the needs of the dissertation, utensils and analyzers were used from the genetics laboratory of the department, where the preparation of the samples took place. The spectrophotometer and the incubator of the 'nutrition physiology' laboratory were then utilized. After the samples being ready for culture were placed in the incubator. Photometry was performed 3 times a day and then repositioned in the incubator until the next photometry for the growth of microorganisms. A total of 9 photometric measurements were performed, at a strict schedule every 8 hours, therefore the duration of the experiment was approximately 3.5 days. The results showed that microorganisms grew in both LBo medium, where antibiotic was added, and LB-, where no antibiotic was added. In this way it was proved that there is resistance to oxytetracycline.



5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΕΛΛΗΝΙΚΗ:

ΠΑΝΑΓΟΥ ΑΣΗΜΩ, 2009 «Διαχείριση αντιβιοτικών ουσιών σε ιχθυοκαλλιέργειες»

Τζίτζιμπάσης Δημήτρης 2011 «Φαρμακευτικές ουσίες που χρησιμοποιούνται στις ιχθυοκαλλιέργειες»

Γούγας Ιωάννης, 2006 «Εντοπισμός γονιδίων ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά βακτηρίων από ιχθυοκαλλιέργειες»

Καλόγηρος Παναγιώτης, 2010 «Αβιοτικοί παράγοντες που επιδρούν στην αποδόμηση των αντιβιοτικών που χρησιμοποιούνται στις ιχθυοκαλλιέργειες»

Αθανάσιου Τσαγκαδούρα, «Αντιβιοτικά- Μηχανισμός Δράσης. Υπολογιστική Πρόβλεψη Αναστολής της DNA γυράσης του *E.coli* από νέες χημικές ενώσεις με τη μέθοδο Docking»

Λιαμάκη Α., Σκιά Γ., 2020 «Καλλιεργήσιμα βακτήρια με ανθεκτικότητα στην οξυτετρακυκλίνη από την υδάτινη στήλη του ταμιευτήρα της Κάρλας»

ΔΙΕΘΝΗ:

F.A. Guardiola et. al. 2011 Modulation of the immune parameters and expression of genes of gilthead seabream

(*Sparus aurata* L.) by dietary administration of oxytetracycline

Julieta Griboffa et.al. 2020 Multiantibiotic residues in commercial fish from Argentina. The presence of mixtures of antibiotics in edible fish, a challenge to health risk assessment

Ahran Kim, 2019, Administration of antibiotics can cause dysbiosis in fish gut

Josè Malvisi et.al. 1996 Tissue distribution and residue depletion of oxytetracycline in sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) after oral administration



G.Rigos et.al. 2004 Bioavailability of oxytetracycline in sea bass, *Dicentrarchus labrax*

Rosado D et.al. , 2019, Effects of disease, antibiotic treatment and recovery trajectory on the microbiome of farmed seabass (*Dicentrarchus labrax*)

Lucias Santos et.al. 2019 Detection and quantification of 47 antibiotic residues in farmed European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) using a multi-class and multi-residue UHPLC-MS/MS method

Rezaei, S.S. et.al 2020 «Photocatalytic oxidation of tetracycline by magnetic carbon-supported TiO₂ nanoparticles catalyzed peroxydisulfate: Performance, synergy and reaction mechanism studies»

Fotini Kokou et. al. 2020, «Antibiotic effect and microbiome persistence vary along the European seabass gut»

Kalantzi, I. et.al. 2021 «Fish farming, metals and antibiotics in the eastern Mediterranean Sea: Is there a threat to sediment wildlife»

